

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 03-218309

(43)Date of publication of application : 25.09.1991

(51)Int.Cl.

A61K 9/127
A61K 47/24
A61K 47/34
// A61K 37/14

(21)Application number : 02-290929

(71)Applicant : TERUMO CORP

(22)Date of filing : 30.10.1990

(72)Inventor : YOSHIOKA HIROSHI
OGATA YOSHITAKA
GOTO AKIHISA

(30)Priority

Priority number : 40128491 Priority date : 02.11.1989 Priority country : JP

(54) ADSORPTION-SUPPRESSING AGENT FOR PROTEIN TO SURFACE OF LIPOSOME

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain the subject suppressing agent capable of obtaining liposome having suppressed adsorption of protein by adding to a suspension of liposome, comprising polyethylene glycol whose both ends are bonded with hydrogenated natural phospholipid.

CONSTITUTION: Both ends of polyethylene glycol are bonded with hydrogenated natural phospholipid (preferably hydrogenated natural phosphatidylethanolamine) to obtain the subject suppressing agent. Next, said suppressing agent is added to a suspension of liposome and mixed, then said suppressing agent is contained in a lipid layer of liposome to obtain liposome having suppressed adsorption of protein. Adsorption of plasma protein to liposome is suppressed by exposing of hydrophilic PEG on the surface of the liposome, and as the result, aggregation of liposome in the plasma is prevented, thus any fear of blood flow inhibition due to obturation is not raised even in a case of using as artificial erythrocytes.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

⑫ 公開特許公報(A)

平3-218309

⑬ Int. Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 平成3年(1991)9月25日

A 61 K 9/127

F 7624-4C

47/24

J 7624-4C

47/34

J 7624-4C

// A 61 K 37/14

8615-4C

審査請求 未請求 請求項の数 8 (全9頁)

⑮ 発明の名称 リボソーム表面への蛋白質吸着抑制剤

⑯ 特 願 平2-290929

⑰ 出 願 平2(1990)10月30日

優先権主張 ⑱ 平1(1989)11月2日 ⑲ 日本(JP) ⑳ 特願 平1-284912

㉑ 発 明 者 吉 岡 浩 神奈川県足柄上郡中井町井ノ口1500番地 テルモ株式会社
内
㉒ 発 明 者 緒 方 嘉 貴 神奈川県足柄上郡中井町井ノ口1500番地 テルモ株式会社
内
㉓ 発 明 者 後 藤 彰 久 神奈川県足柄上郡中井町井ノ口1500番地 テルモ株式会社
内
㉔ 出 願 人 テ ル モ 株 式 会 社 東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目44番1号
㉕ 代 理 人 弁 理 士 高 木 千 嘉 外1名

明 細 書

1. 発明の名称 リボソーム表面への蛋白質
吸着抑制剤

2. 特許請求の範囲

- 1) ポリエチレングリコール結合水素添加天然リン脂質からなることを特徴とするリボソーム表面への蛋白質吸着抑制剤。
- 2) ポリエチレングリコールの両末端に水素添加天然リン脂質が結合しているものである請求項1記載のリボソーム表面への蛋白質吸着抑制剤。
- 3) ポリエチレングリコール結合水素添加天然リン脂質の水素添加天然リン脂質部分がリボソーム膜を構成する脂質層に固定され、ポリエチレングリコール部分がリボソーム表面から外方向に伸びてなる蛋白質の吸着が抑制されたりボソーム。
- 4) ポリエチレングリコールの両末端に結合した水素添加天然リン脂質がリボソームを構成する脂質層に固定され、ポリエチレングリコール部分がループ状にリボソーム表面から外方向に伸びてな

る請求項3記載の蛋白質の吸着が抑制されたりボソーム。

- 5) リボソームの懸濁液に請求項1に記載のリボソーム表面への蛋白質吸着抑制剤を添加し、次いで該懸濁液からリボソームを採取することの特徴とする蛋白質の吸着が抑制されたりボソームの製法。
- 6) 請求項1又は2に記載の蛋白質吸着抑制剤をリボソーム膜構成脂質と均一に混合し、得られた混合物を用いてリボソームを形成させることを特徴とする蛋白質の吸着が抑制されたりボソームの製法。
- 7) ポリエチレングリコール結合水素添加天然リン脂質がポリエチレングリコール結合水素添加天然ホスファチジルエタノールアミンである請求項1～6のいずれかの項に記載の蛋白質吸着抑制剤あるいはリボソームもしくはその製法。
- 8) ポリエチレングリコール結合水素添加天然リン脂質からなることを特徴とするリボソーム凝集防止剤。

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明はリボソーム表面への蛋白質吸着抑制剤に関する。

本発明はさらにリボソーム凝集防止剤に関する。

本発明はさらに蛋白質吸着の抑制されたあるいはリボソーム同士の凝集が防止されたリボソームおよびその製法に関する。

〔従来の技術〕

リボソームを水溶性あるいは脂溶性の薬物の担体として利用しようとする試みが広く行われている (Gregoriadis et al., Ann. N. Y. Acad. Sci., 446, 319(1985))。また、リボソームの含水相に動物の酸素運搬体であるヘモグロビンを含ませ、リボソームを人工赤血球として利用する試みも行われている (特開昭82-178521)。

〔発明が解決しようとする課題〕

リボソームを薬物等の運搬体として利用する場合、リボソームを生体の血管内へ投与する必要がある。しかし、従来一般に使用されているリボ

ソーム膜が脂質のみから成るリボソームは、生体の血漿中の蛋白質 (例えばアルブミン、グロブリン、フィブリノーゲン等) を吸着し、吸着された蛋白質を介してリボソーム同士が凝集するという問題があった。特にリボソームの粒径が $0.1\mu\text{m}$ を超える場合に、この問題は顕著であった。通常一般に利用されるリボソームの粒径は $0.1\mu\text{m} \sim 1\mu\text{m}$ であって、そのままの状態であれば、毛細血管でも内径が数 μm があるので生体の血管内を通過するのに障害とはならない。しかしながら、リボソームが血漿中の蛋白質を吸着することにより凝集してしまうと、その凝集物の大きさは数十 μm にも達する。もし、血管内で凝集が生起すればリボソームの凝集物が血管を栓塞し、血流を阻害して生体を死に至らしめる危険性がある。

特にリボソームを人工赤血球として利用する場合、大量のリボソームを投与しなければならず、血漿中でのリボソームの凝集は無視できない問題であった。しかし、血漿中でのリボソームの凝集を防止する技術は従来全くなかった。

- 3 -

また、リボソームを生体内に投与した場合、リボソームを抗原とした抗体としての蛋白質 (イムノグロブリン) がリボソームに吸着し、食食細胞 (マクロファージ) に異物認識を与え、リボソームがマクロファージに取り込まれ、リボソームが短時間のうちに消失してしまう。そこでリボソーム表面への蛋白質吸着を抑制することにより、血漿中におけるリボソームの消失時間を遅延させることができる。

さらにリボソームを人工赤血球として利用する場合、血液中に存在する赤血球に対して溶血等の有害な作用のないリボソームが望まれる。

従って本発明の目的は、リボソーム表面への蛋白質吸着抑制剤およびリボソーム凝集防止剤、血漿中での蛋白質吸着が抑制されたリボソームおよびその製法を提供することにある。さらに本発明の目的は、リボソームを人工赤血球として使用する場合に、溶血等の毒作用のないリボソームを提供することにある。

- 5 -

- 4 -

〔問題点を解決するための手段〕

上記目的を達成するため、本発明者が鋭意研究を重ねた結果、リボソームの脂質層に特定の蛋白質吸着抑制剤を含有させることにより血漿中で蛋白質がリボソーム表面に吸着するのを防止することができ、ひいてはリボソーム同士の凝集を防止することができることを見出し、本発明を完成した。

本発明によれば下記のリボソーム表面への蛋白質吸着抑制剤、リボソーム凝集防止剤、これらを含有するリボソームおよびその製法が提供される。

- 1) ポリエチレングリコール結合水素添加天然リン脂質からなることを特徴とするリボソーム表面への蛋白質吸着抑制剤。
- 2) ポリエチレングリコールの両末端に水素添加天然リン脂質が結合しているものである1項記載のリボソーム表面への蛋白質吸着抑制剤。
- 3) ポリエチレングリコール結合水素添加天然リン脂質の水素添加天然リン脂質部分がリボソーム膜を構成する脂質層に固定され、ポリエ

- 6 -

チレングリコール部分がリボソーム表面から外方向に伸びてなる蛋白質が抑制されたりリボソーム。

4) ポリエチレングリコールの両末端に結合した水素添加天然リン脂質がリボソームを構成する脂質層に固定され、ポリエチレングリコール部分がループ状にリボソーム表面から外方向に伸びてなる3項記載の蛋白質の吸着が抑制されたりリボソーム。

5) リボソームの懸濁液に1項に記載のリボソーム表面への蛋白質吸着抑制剤を添加し、次いで該懸濁液からリボソームを採取することを特徴とする蛋白質の吸着が抑制されたりリボソームの製法。

6) 1又は2項に記載の蛋白質吸着抑制剤をリボソーム膜構成脂質と均一に混合し、得られた混合物を用いてリボソームを形成させることを特徴とする蛋白質の吸着が抑制されたりリボソームの製法。

7) ポリエチレングリコール結合水素添加天然

リン脂質がポリエチレングリコール結合水素添加天然ホスファチジルエタノールアミンである1～6項のいずれかの項に記載の蛋白質吸着抑制剤あるいはリボソームもしくはその製法。

8) ポリエチレングリコール結合水素添加天然リン脂質からなることを特徴とするリボソーム凝集防止剤。

本発明におけるリボソーム表面への蛋白質吸着抑制剤またはリボソーム凝集防止剤は、ポリエチレングリコール（以下PEGという）と水素添加天然リン脂質とが結合したポリエチレングリコール結合水素添加天然リン脂質（以下PEG結合リン脂質という）である。

本発明におけるPEG結合リン脂質は、水素添加天然リン脂質の親水部（極性頭部）にポリエチレングリコール（PEG）を共有結合した構造を有し、1分子中に1または複数のPEG鎖を含有する。PEG鎖の該リン脂質と結合していない側の末端は、水酸基あるいはメチル、エチル等の短鎖のエーテル、酢酸、乳酸等の短鎖のエステルで

— 7 —

あっても良い。またPEG鎖の両末端に水素添加天然リン脂質を共有結合した構造でもよい。

本発明の目的のためには、PEG結合リン脂質分子中のPEG鎖長は、平均重合度で5～1000モルの範囲が望ましく、より好ましくは40～200モルである。この範囲を下回る場合には血漿中での蛋白質の吸着抑制およびリボソーム凝集防止効果が発現され難く、この範囲を上回る場合にはPEG結合リン脂質の水溶性が高くなり、リボソーム膜中に固定され難くなる。

本発明のPEG結合水素添加天然リン脂質における水素添加天然リン脂質としては、天然のリン脂質を常法に従って水素添加したものが用いられる。

大豆レシチン、卵黄レシチン、ホスファチジルエタノールアミン等の天然のリン脂質は全て不飽和脂肪酸を分子中に含んでいるが、本発明においては上記天然リン脂質の不飽和脂肪酸を水素で飽和した水素添加天然リン脂質が使用される。合成ジパルミトイルレシチンホスファチジルエタノール

アミンは分子中に不飽和脂肪酸を含んでおらず、リボソーム表面への蛋白質吸着抑制作用やリボソーム凝集防止作用は水素添加天然リン脂質と同等であるが、価格の高い点および溶血作用が見られる点で劣っている。

本発明において用いる水素添加天然リン脂質の水素添加度は臨界的ではないがヨウ素価で表わして30以下、好ましくは10以下である。水素添加天然リン脂質の例としては、レシチン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルセリン、ホスファチジルグリセロール、スフィンゴミエリン、カルジオリジン等を常法に従って水素添加したものがあげられる。

特に水素添加天然ホスファチジルエタノールアミンが好ましい。

PEGと上記リン脂質と共有結合させるには該リン脂質の極性部に反応活性な官能基が必要である。これには、ホスファチジルエタノールアミンのアミノ基、ホスファチジルグリセロールの水酸

— 9 —

— 10 —

基、ホスファチジルセリンのカルボキシル基等があり、ホスファチジルエタノールアミンのアミノ基が好ましく利用される。

該リン脂質の反応活性な官能基とPEGを共有結合させるには、塩化シアヌルを用いる方法、カルボジイミドを用いる方法、酸無水物を用いる方法、グルタルアルデヒドを用いる方法、等がある。ホスファチジルエタノールアミンのアミノ基とPEGを結合するには、塩化シアヌル(2,4,6-トリクロロ-s-トリアジン)を用いる方法が好ましく利用される。例えば、モノメトキシポリエチレングリコールと塩化シアヌルを公知の反応操作で結合することにより、2-O-メトキシポリエチレングリコール-4,6-ジクロロ-s-トリアジン(活性化PEG1)または2,4-ビス(O-メトキシポリエチレングリコール)-6-クロロ-s-トリアジン(活性化PEG2)が得られる(Y. Inada, et al., Chem. Lett., 7, 773-776(1980))。これらとアミノ基を脱塩酸縮合反応により結合させることで、ホスファチジルエタ

ノールアミンの極性頭部にPEGを共有結合させたリン脂質が得られる。ここで、活性化PEG1を用いた場合は1分子のリン脂質中に1本のPEG鎖を、活性化PEG2を用いた場合は2本のPEG鎖を含有することになる。また、モノメトキシPEGと無水コハク酸を反応させてPEG末端にカルボキシル基を導入し、これとホスファチジルエタノールアミンをカルボジイミド存在下で反応させることにより、アミド結合を介したPEG結合リン脂質が得られる。

本発明のPEG結合リン脂質を脂質層に含有するリボソームを製造するには、PEG結合リン脂質をリボソーム形成脂質と予め均一に混合して、得られた混合脂質を用いて常法によりリボソームを形成させれば良い。リボソーム形成脂質に対するPEG結合リン脂質の混合比は、モル比で0.1モル%~50モル%、好ましくは0.5モル%~20モル%、より好ましくは1モル%~5モル%である。この範囲を下回る場合には、血漿中でのリボソーム凝集防止効果が不十分となり、この範囲を上回

- 11 -

る場合には、PEG結合リン脂質の可溶化能により、リボソームが不安定となる。

PEG結合リン脂質と予め均一に混合するには、例えば、両者を揮発性の有機溶媒に溶解させた後、エバポレーションにより、有機溶媒を除去すれば良い。もし、脂溶性の薬物等をリボソームに含有させるのであれば、このとき、リボソーム形成脂質と共に混合しておけば良い。得られた混合脂質からリボソームを形成させるには、通常一般に行われているリボソーム化の方法に従って行うことが可能であり、例えば、振とう法、超音波照射法、フレンチプレス法等いずれの方法を用いても良い。上記のPEG結合リン脂質を上記の範囲で使用するかぎりにおいては、粒径0.1 μ m~1 μ mのリボソームが得られ、内水相に十分な水溶性の薬物や生理活性物質等を担持させることができる。得られたリボソームの脂質層中にはPEG結合リン脂質が含有されているが、その含有率は必ずしも初めの脂質との混合割合と同一ではない。PEG結合リン脂質の水溶性が高い場合にはリボソーム化

- 12 -

の過程で、その一部が膜外の水相中に溶出している場合もありうる。リボソーム脂質膜中におけるPEG結合リン脂質の存在状態は明らかではないが、PEG結合リン脂質の疎水性部がリボソーム膜中の疎水性領域内にあって、親水性のPEG鎖が膜中の親水性領域から膜外の水相媒体中にかけて存在しているものと推定される。特にPEGの両末端にリン脂質が結合した構造を有するPEG結合リン脂質の場合には、両末端のリン脂質がリボソーム膜中の疎水性領域に疎水性相互作用によって固定され、親水性のPEG鎖はリボソーム膜中の親水性領域へあるいは膜外の水性媒体中へループ状に露出しているものと推定される。従って、本方法によって得られたリボソームにおいては、PEG結合リン脂質のPEG鎖がリボソームの外水相側及び内水相側の両側に存在することになる。

本発明のPEG結合リン脂質は、必ずしも水に透明に溶解する必要はない。しかし、本発明のPEG結合リン脂質が水に対し、均一に溶解する

- 13 -

-106-

- 14 -

場合は、さらに別の方法によっても本発明のリボソームを製造することができる。すなわち、通常一般に行われているリボソーム化の方法に従って製造された、すでに水溶性あるいは脂溶性の薬物等を担持しているリボソームの懸濁液に、本発明のPEG結合リン脂質をそのままあるいは水溶液として添加することによっても、本発明のPEG結合リン脂質を脂質層中に含有するリボソームを製造することができる。この場合、PEG結合リン脂質は水溶液中でミセル様の分子集合体を形成して分散していると思われるが、ここにリボソームが共存すれば、PEG結合リン脂質分子中の疎水性部が、リボソーム膜中の疎水性領域に疎水的相互作用によって固定され、親水性のPEG鎖はリボソームの外水相側表面にのみ露出した構造となる。

PEG結合リン脂質を水溶液として添加する場合、その濃度は、臨界ミセル濃度以上であれば良いが、その濃度が低いと、リボソームへの吸着量が不十分となり血漿中でのリボソーム凝集防止効

果が低下し、その濃度が高すぎるとリボソームを不安定にし、内水相に露出された水溶性薬物等の漏れ出しを引き起こしてしまう。従って、その濃度はリボソーム懸濁液中の濃度で0.01%~20%、より好ましくは、0.05%~2%である。

本発明のPEG結合リン脂質を脂質層に含有するリボソームは、また別の方法によっても製造することができる。すなわち反応活性な官能基を持つリン脂質を含有するリボソームを常法にて製造した後、リボソーム外液に片末端活性化PEGを添加してリン脂質と結合させる。例えば、ホスファチジルエタノールアミンを全リン脂質中1モル%~50モル%含有するリボソームを製造し、塩基性(pH9以上)緩衝液中、活性化PEG2を1%~20%の濃度で添加し、室温で1時間~24時間反応させる。この場合、親水性のPEG鎖はリボソームの外水相側表面にのみ露出した構造となる。

本発明で使用するリボソーム形成脂質は、ホスファチジルコリン(レシチン)、スフィンゴミエ

- 15 -

リン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン等に代表されるリン脂質で卵黄、大豆その他の天然材料に由来するもの、または、有機化学的な合成手段により得られるものを単独でまたは混合して主成分とする。さらに膜安定化剤としてコレステロール、コレスクノール等のステロール類や、荷電物質としてホスファチジン酸、ジセチルホスフェート、高級脂肪酸等を添加しても良い。

特に、これらリン脂質が不飽和結合を有する場合、これが過酸化反応を受けることによって発生する脂質過酸化化物による毒性の問題、また内包ヘモグロビンが酸化変性を受け易いといった問題があるため、この不飽和基に水素添加したものが好適に用いられる。例えば、入手が容易な水素添加天然リン脂質として水素添加卵黄レシチン、水素添加大豆レシチンなどがある。これら水素添加天然リン脂質を主成分とする場合、その相転移温度は50℃程度と高温である。一般にリボソームは相転移温度以上で操作しなければ形成され難いが、

- 17 -

- 16 -

ヘモグロビンをリボソーム化する場合、40℃以上で操作するとヘモグロビンが熱変性を受けてしまう。しかし、リボソーム形成脂質としてステロール類を含有させれば、脂質混合物全体として明確な相転移点が存在しなくなり、操作温度が主成分リン脂質の相転移温度以下でも十分に人工赤血球を製造することができる。また、生成した人工赤血球同士が凝集することを防止するために通常、荷電物質を含有させるが、これには高級飽和脂肪酸が好ましく用いられる。これらリボソーム形成脂質の混合比率はリン脂質1重量部に対してステロール類0.2~1重量部、高級飽和脂肪酸0.05~0.2重量部が適当である。

PEG結合リン脂質とリボソーム形成脂質を混合するには、例えばクロロホルム、ジクロロメタン等のPEG結合リン脂質とリボソーム形成脂質を均一に溶解しうる揮発性有機溶媒に、これらを均一溶解後、有機溶媒をエバポレーション、凍結乾燥、スプレードライ等の方法により除去すれば良い。

- 18 -

得られた混合脂質から人工赤血球を形成させるには、ヘモグロビン水溶液と混合脂質を水和分散させればよい。水和分散の方法は単に両者を機械的に混合するだけでも良いが、さらに、フレンチプレス細胞破砕機等を用いての高圧吐出処理を行うことが望ましい。ヘモグロビン水溶液のヘモグロビン濃度は30~80%が好ましく、この範囲を下回る場合には、ヘモグロビンのカプセル化効率が低く、この範囲を上回る場合には、ヘモグロビン水溶液の粘度が著しく高くなり、PEG結合リン脂質を加えた場合でも、水和分散が困難になる。

特に、水素添加リン脂質、ステロール類、高級飽和脂肪酸を上記範囲で混合したリポソーム形成脂質と上記範囲のヘモグロビン水溶液を使用する本発明の人工赤血球の製造方法においては、ヘモグロビнкаプセル化効率の著しく低い粒径 $0.01\mu\text{m}\sim 0.03\mu\text{m}$ の人工赤血球は殆ど生成せず、大部分が粒径 $0.1\mu\text{m}$ 以上のヘモグロビнкаプセル化効率の高い人工赤血球となる。

- 19 -

エバポレーションにより有機溶媒を除去した。得られた混合脂質に50%ヘモグロビン水溶液20mlを加え、振とう混合後、 $250\text{kg}/\text{cm}^2$ の圧力でフレンチプレス処理を10回繰り返した。得られたフレンチプレス処理液を生理食塩水により10倍に希釈して遠心分離処理(17,000r.p.m.30分)し、沈澱リポソームを生理食塩水140mlにより、さらに遠心洗浄を2回繰り返した。洗浄後の沈澱リポソームをヘモグロビン濃度で5%となるように生理食塩水中に懸濁させた。得られたリポソームの平均粒径は $0.2\mu\text{m}$ であった。このリポソーム懸濁液0.1mlとクエン酸加ヒト血漿0.5mlを混合し、光学顕微鏡(400倍)により観察したところ、 $1\mu\text{m}$ を超えるリポソーム凝集物はほとんど認められなかった。

実施例 2

水素添加卵黄レシチン630mg、コレステロール317mg、ミリスチン酸53mgをジクロロメタン20mlに溶解し、エバポレーションにより有機溶媒を除去した。得られた混合脂質に50%ヘモグロビン水

得られた人工赤血球の脂質層中にはPEG結合リン脂質が含有されて、その含有率は必ずしも初めの脂質との混合割合と同一ではない。PEG結合リン脂質の水溶性が高い場合にはリポソーム化の過程で、その一部が膜外の水相中に溶出している場合もありうる。

次に実施例および比較例を示して本発明をさらに具体的に説明する。

実施例 1

水素添加天然ホスファチジルエタノールアミン 150mg、活性PEG 2 (PEG平均分子量 $5,000\times 2$ 、生化学工業製) 2.5gを脱水クロロホルム50mlに溶解、炭酸ナトリウム2gを加えて、室温で終夜反応させた。ニンヒドリン呈色の消失により反応終了を確認後、反応液を濾過し、ヘキサンを加えて再沈精製、真空乾燥してPEG結合リン脂質を得た。

水素添加卵黄レシチン630mg、コレステロール317mg、ミリスチン酸53mg、上記のPEG結合リン脂質150mgをジクロロメタン20mlに溶解し、

- 20 -

溶液20mlを加え、振とう混合後、 $500\text{kg}/\text{cm}^2$ の圧力でフレンチプレス処理を10回繰り返した。得られたフレンチプレス処理液を生理食塩水により10倍に希釈して遠心分離処理(17,000r.p.m.30分)し、沈澱リポソームを生理食塩水140mlにより、さらに遠心洗浄を2回繰り返した。洗浄後の沈澱リポソームをヘモグロビン濃度で5%となるように生理食塩水中に懸濁させた。得られたリポソームの平均粒径は $0.2\mu\text{m}$ であった。このリポソーム懸濁液0.1mlとクエン酸加ヒト血漿0.5mlを混合し、光学顕微鏡(400倍)により観察したところ、リポソームは完全に凝集し、その凝集物の大きさは $50\mu\text{m}$ を超えるものであった。

ヘモグロビン濃度で5%に調整した上記のリポソーム懸濁液1mlに、1%の実施例1で得られたPEG結合リン脂質を含む生理食塩水9mlを加え、室温で30分間放置した後、生理食塩水により10倍に希釈して遠心分離処理(17,000r.p.m.30分)し、沈澱リポソームを生理食塩水140mlにより、さらに遠心洗浄を2回繰り返した。洗浄後の沈澱リポ

- 21 -

- 22 -

ソームをヘモグロビン濃度で5%となるように生理食塩水中に懸濁させた。リボソーム懸濁液0.1mlとクエン酸加ヒト血漿0.5mlを混合し、光学顕微鏡(400倍)により観察したところ、1 μ mを超えるリボソーム凝集物はほとんど認められなかった。

実施例 3

水素添加天然ホスファチジルエタノールアミンを30モル%含有する水素添加大豆レシチンを水素添加卵黄レシチンのかわりに用いる以外は実施例2と同様にして、ヘモグロビン含有リボソームを得た。0.1Mほう酸緩衝液(pH10)中ヘモグロビン濃度で5%に調整した上記のリボソーム懸濁液1mlに、活性化PEG2を100 μ g添加し、室温で終夜反応させた。生理食塩水により10倍に希釈して遠心分離処理(17,000r.p.m.30分)し、沈殿リボソームを生理食塩水140mlにより、さらに遠心洗浄を2回繰り返した。洗浄後の沈殿リボソームをヘモグロビン濃度で5%となるように生理食塩水中に懸濁させた。このリボソーム懸濁液0.1

— 2.3 —

社製) 50gを、1,2-ジクロロエタン250mlに溶解し、これに無水コハク酸10gとピリジン8mlを加えて、3日間沸点還流した。濾過、エバポレーション後、100mlの蒸留水に溶解し、水相をエーテルで洗浄後、クロロホルム100mlに抽出した。エバポレーション後、酢酸エチルで再結晶して両末端カルボキシPEGを得た(数平均分子量4340)。これを3.00gと水素添加天然ホスファチジルエタノールアミン2.5g、さらに1,1'-カルボニルジイミダゾール270 μ gを、30mlのクロロホルムに溶解し、50℃で終夜反応させた。エバポレーション後、エタノール100mlを加えて加熱溶解した。室温まで放冷した後、濾過、エバポレーションした。さらにクロロホルム50mlに溶解後、ジエチルエーテル500mlに再沈させ、ガラスフィルターで濾集した。真空乾燥後、RO水1 ℓ に溶解し、0.2 μ フィルターで濾過した。濾液を凍結乾燥して、アミド結合を介してPEG両末端にリン脂質が結合したPEG結合リン脂質を得た。これを用いた実施例1および2と同様の実験で同

— 2.5 —

mlとクエン酸加ヒト血漿0.5mlを混合し、光学顕微鏡(400倍)により観察したところ、1 μ mを超えるリボソーム凝集物はほとんど認められなかった。

実施例 4

モノメトキシPEG5000(ユニオンカーバイド社製) 50gを1,2-ジクロロエタン250mlに溶解、無水コハク酸5gとピリジン4mlを加えて、3日間沸点還流した。濾過、エバポレーション後、100mlの蒸留水に溶解し、水相をエーテルで洗浄後クロロホルム100mlに抽出した。エバポレーション後、酢酸エチルで再結晶して片末端カルボキシPEGを得た。これを725 μ gと水素添加天然ホスファチジルエタノールアミン100 μ g、さらにジシクロヘキシルカルボジイミド80 μ gを30mlのクロロホルムに溶解、50℃で終夜反応させた。反応液をヘキサン300mlに再沈してアミド結合を介するPEG結合リン脂質を得た。これを用いた実施例1および2と同様の実験で同様の結果を得た。

実施例 5

ポリエチレングリコール(ユニオンカーバイド

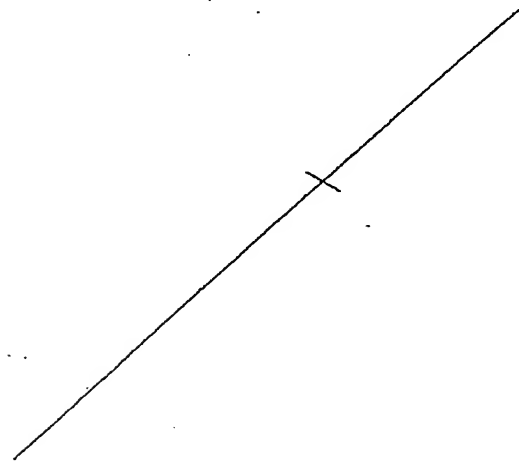
— 2.4 —

様の結果を得た。

試験例

所定濃度の試料を含む被験液0.8mlにヘモグロビン濃度2.5%の家兔洗浄赤血球0.2mlを添加し、37℃で24時間静置後、1,000r.p.mで10分間遠心し、上清中のヘモグロビン量を定量して溶血率を求めた。

結果を表1に示す。



— 2.6 —

表 1

溶血率 (%)

濃度 (μg/ml)	CH40	CH400	DPPE・2K	DPPE・5K	HEPE・2K	HEPE・5K
0.005	29	19	12	11	-	-
0.02	93	49	30	25	-	-
0.04	100	60	46	41	-	-
0.08	-	68	59	58	-	-
0.16	-	65	67	66	-	-
0.32	-	68	69	70	-	-
0.63	-	70	74	76	0	2
1.25	-	74	80	79	0	5
2.5	-	-	-	-	0	7
5	-	-	-	-	0	18
10	-	-	-	-	21	29

(注)

CH40 : コレステロールとPEG (平均重合度40) とをエーテル結合したリポソーム表面への蛋白吸着抑制剤

CH400 : コレステロールとPEG (平均重合度400) とをエーテル結合したリポソーム表面への蛋白吸着抑制剤

DPPE・2K : ジバシリンホスファチジルエタノールアミンとPEG (平均分子量2,000) とを結合したリポソーム表面への蛋白吸着抑制剤

DPPE・5K : ジバシリンホスファチジルエタノールアミンとPEG (平均分子量5,000) とを結合したリポソーム表面への蛋白吸着抑制剤

HEPE・2K : 水素添加卵黄ホスファチジルエタノールアミンとPEG (平均分子量2,000) とを結合した本発明に係るリポソーム表面への蛋白吸着抑制剤

HEPE・5K : 水素添加卵黄ホスファチジルエタノールアミンとPEG (平均分子量5,000) とを結合した本発明に係るリポソーム表面への蛋白吸着抑制剤

上記の試験の結果から、本発明の蛋白質吸着抑制剤は他の蛋白質吸着抑制剤に比しては溶血毒性が低いことが明らかである。また上記の表に示さないポリエチレングリコールの両末端にリン脂質を結合した構造の蛋白質吸着抑制剤についても同様に溶血毒性が低いことが確認された。

〔発明の効果〕

以上詳しく説明したように、本発明によればリボソームの脂質層に特定の蛋白質吸着抑制剤を含有させることによって、血漿中でのリボソームへの蛋白質の吸着を抑制し、リボソームの凝集を防止したりリボソームを提供することができる。

蛋白質吸着抑制剤は疎水性であるリン脂質と親水性高分子鎖であるポリエチレングリコールの結合体であり、親水部がリボソームの表面に露出していることによって、血漿タンパクのリボソームへの吸着が抑制され、その結果、血漿中でのリボソームの凝集が防止される。従って、生体の血管内へリボソームを投与した場合でも、リボソームの凝集物が血管内で栓塞して血流を阻害する心配

がなく、特に大量のリボソームを投与する必要のある人工赤血球として毒性が高い。

さらに、本発明の蛋白質吸着抑制剤はポリエチレングリコールと水素添加天然リン脂質との結合体からなり、溶血毒性が低いという特長を有する。従って本発明の蛋白質吸着抑制剤は人工赤血球としてのリボソームに特に好適に適用される。

本発明のリボソームの製造方法は、リボソーム形成脂質と蛋白質吸着抑制剤を予め均一に混合して、得られた混合脂質を用いて常法によりリボソームを形成させる方法及び常法により製造されたリボソームの懸濁液に蛋白質吸着抑制剤を添加する方法であるので、従来知られているリボソームの応用技術のいずれの例にも広く適用することができる。

さらに本発明のリボソーム蛋白質吸着抑制剤を使用することにより、リボソーム形成脂質の水和分散が促進され、高濃度のヘモグロビン水溶液を用いた場合でも、ヘモグロビンカプセル化効率の高い人工赤血球を高い収率で得ることができる。

— 28 —

— 29 —

特に、水素添加リン脂質、ステロール類、高級飽和脂肪酸を混合したリボソーム形成脂質と高濃度のヘモグロビン水溶液を使用する本発明の人工赤血球の製造方法においては、ヘモグロビンカプセル化効率の著しく低い粒径 $0.01\mu\text{m}\sim 0.03\mu\text{m}$ の人工赤血球は殆ど生成せず、大部分が粒径 $0.1\mu\text{m}$ 以上のヘモグロビンカプセル化効率の高い人工赤血球となる。

本発明の製造方法で得られるヘモグロビンカプセル化効率の高い人工赤血球では、人工赤血球懸濁液中のヘモグロビン濃度を高くしても、全脂質濃度は低く抑えることができるので、循環血流中へ投与した時の循環動態に与える悪影響も少なく、また脂質に由来する毒性も低く抑えることができる。しかも、従来の脂質分散のための手法はそのまま適用できるので、工業的な人工赤血球の製造方法として広範に応用し得る極めて優れた方法である。

— 30 —

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第3部門第2区分

【発行日】平成11年(1999)4月20日

【公開番号】特開平3-218309

【公開日】平成3年(1991)9月25日

【年通号数】公開特許公報3-2184

【出願番号】特願平2-290929

【国際特許分類第6版】

A61K 9/127

47/24

47/34

【FI】

A61K 9/127 F

47/24 J

47/34 J

手 続 補 正 書

平成9年9月 日

特許庁長官 宮 井 秀 光 閣

1. 事件の表示

平成8年特許第290929号

2. 補正をする旨

事件との関係 特許出願人

住 所 東京都渋谷区神宮寺2丁目44番1号

名 称 テルマ株式会社

3. 代理人

住 所 東京都千代田区豊町一丁目10番地(麹町広井ビル)

電話 (3261) 2012

氏 名 (3173) 高 本 千 恵

(外1名)

4. 補正命令の日付 (出発)

5. 補正対象事項名

明 細 書

6. 補正対象項目名

発 明 説 明 書 の 記 載

7. 補正の内容

特許請求の範囲を異紙のとおりに補正します。

2. 特許請求の範囲

1) ポリエチレングリコール結合水素添加天然リン脂質からなることを特徴とするリポソーム表面への蛋白質吸着膜形成。

2) ポリエチレングリコールの両末端に水素添加天然リン脂質が結合しているものである請求項1記載のリポソーム表面への蛋白質吸着膜形成。

3) ポリエチレングリコール結合水素添加天然リン脂質がポリエチレングリコール結合水素添加天然ホスファチジルエタノールアミンである請求項1または請求項2に記載の蛋白質吸着膜形成。

4) ポリエチレングリコール結合水素添加天然リン脂質の水素添加天然リン脂質部分がリポソーム膜を構成する脂質層に固定され、ポリエチレングリコール部分がリポソーム表面から外方向に伸びてなる蛋白質の吸着が抑制されリポソーム。

5) ポリエチレングリコール結合水素添加天然リン脂質がポリエチレングリコール結合水素添加天然ホスファチジルエタノールアミンである請求項4に記載のリポソーム。

6) ポリエチレングリコールの両末端に結合した水素添加天然リン脂質がリポソームを構成する脂質層に固定され、ポリエチレングリコール部分がループ状にリポソーム表面から外方向に伸びてなる請求項4記載の蛋白質の吸着が抑制されリポソーム。

7) ポリエチレングリコール結合水素添加天然リン脂質がポリエチレングリコール結合水素添加天然ホスファチジルエタノールアミンである請求項4に記載のリポソーム。

8) リポソームの脂質層に請求項1ないし3のいずれかの項に記載の

リボソーム表面への蛋白質等の制御を施し、次いで該表面からリボソームを排除することを特徴とする蛋白質の膜が制御されたリボソームの製造。

- 9) 請求項1ないし8のいずれかの項に記載の蛋白質等の制御をリボソーム基形成能質と均一に混合し、得られた混合物を用いてリボソームを形成させることを特徴とする蛋白質の膜が制御されたリボソームの製造。
- 10) ポリエチレングリコール結合水素添加天然リン脂質からなることを特徴とするリボソーム阻害防止剤。
- 11) ポリエチレングリコール結合水素添加天然リン脂質がポリエチレングリコール結合水素添加天然ホスファチジルエタノールアミンである請求項9に記載のリボソーム阻害防止剤。
- 12) ポリエチレングリコール結合水素添加天然リン脂質を使用することを特徴とするリボソーム阻害防止方法。
- 13) ポリエチレングリコール結合水素添加天然リン脂質の水素添加天然リン脂質部分がリボソーム膜を構成する膜脂質に固定され、ポリエチレングリコール部分がリボソーム表面から外方向に伸びてなるリボソームを使用することを特徴とする請求項12に記載のリボソーム阻害防止方法。
- 14) ポリエチレングリコール結合水素添加天然リン脂質がポリエチレングリコール結合水素添加天然ホスファチジルエタノールアミンである請求項12または13に記載のリボソーム阻害防止方法。